番石榴实蝇性别决定基因 *Bcotra* 和 *Bcotra*-2 的克隆、序列特征及表达分析

刘桂清[1,2]，武　强[1]，和丹阳[1]，张桂芬[1]，李建伟[1]，万方浩[1,3,*]

（1. 中国农业科学院植物保护研究所，植物病虫害生物学国家重点实验室，北京 100193；
2. 广东省昆虫研究所，广东省野生动物保护和利用公共实验室，广东省农业害虫综合治理重点实验室，广州 510260；
3. 青岛农业大学农学与植物保护学院，山东青岛 266109）

摘要：【目的】对番石榴实蝇 *Bactrocera correcta*（Bezzi）性别决定基因 *transformer* 和 *transformer* 2 的 cDNA 和基因组 DNA 序列进行克隆和分析，明确这 2 个基因的结构特征及其在不同发育阶段和雌、雄成虫不同组织中的表达模式，为进一步的功能研究和番石榴实蝇遗传性别品系（genetic sexing strain，GSS）的建立奠定基础。【方法】利用 PCR 结合 RACE 技术克隆番石榴实蝇 2 个性别决定基因的 cDNA 全长和内含子序列，利用不同的生物信息学软件对序列进行结构预测、序列比对和进化树分析；利用半定量 RT-PCR 检测这 2 个基因在番石榴实蝇的不同发育阶段及雌、雄成虫不同组织（精巢、卵巢、中肠和脂肪体）中的表达分布。【结果】克隆得到番石榴实蝇 *transformer* 和 *transformer* 2 的 cDNA 全长序列，分别命名为 *Bcotra* 和 *Bcotra*-2。*Bcotra* 存在性别特异剪接，雌虫 *Bcotra* 的 cDNA 全长 1 673 bp，其开放读码框（ORF）为 1 242 bp，编码 413 个氨基酸（GenBank 登录号为 KP712876）；雄虫 *Bcotra* cDNA 全长 2 025 bp，比雌虫多 2 个外显子，但由于外显子上有多个终止密码子，因此，不能编码完整的有功能的 Tra 蛋白（GenBank 登录号为 KP712877）。*Bcotra*-2 不存在性别特异剪接，cDNA 全长 1 458 bp，其开放读码框（ORF）为 756 bp，编码 251 个氨基酸，具有 RNA 结合蛋白的典型特征（GenBank 登录号为 KM658207）。*Bcotra*-2 有 8 个外显子，7 个内含子。氨基酸序列比对和系统进化关系表明，两个基因的系统发育关系一致，Tra-2 与目前已报道的双翅目 Tra-2 具有很高的同源性，而 Tra 的保守性较 Tra-2 要低。半定量 RT-PCR 结果显示，*Bcotra* 和 *Bcotra*-2 在番石榴实蝇的不同发育阶段及雌、雄成虫不同组织中都有表达。【结论】本研究明确了 *Bcotra* 和 *Bcotra*-2 的基因组 DNA 和 cDNA 结构特征，*Bcotra* 和 *Bcotra*-2 在番石榴实蝇的不同发育阶段和成虫不同组织中均有表达，序列分析发现这两个性别决定基因均具有 Tra/Tra-2 结合位点、内含子剪接抑制序列位点，其中 *Bcotra* 具有 RNA 结合蛋白的结合位点，暗示了这 2 个基因可能通过翻译后相互作用调控雌、雄体性发育。*Bcotra* 存在性别特异剪接，雌虫特有的一段 963 bp 的内含子序列可以用于番石榴实蝇遗传定性品系的载体构建。

关键词：番石榴实蝇；性别决定；*transformer*；*transformer* 2；性别特异剪接；表达谱
中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2015)05-0516-10

Cloning, sequence characterization and expression analysis of sex determining genes *Bcotra* and *Bcotra*-2 in the guava fruit fly, *Bactrocera correcta* (Bezzi) (Diptera: Tephritidae)

LIU Gui-Qing[1,2], WU Qiang[1], HE Dan-Yang[1], ZHANG Gui-Fen[1], LI Jian-Wei[1], WAN Fang-Hao[1,3,*]
(1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Guangdong Key Laboratory of Integrated Pest Management in Agriculture, Guangdong Public Laboratory of Wild Animal Conservation and Utilization, Guangdong Entomological Institute, Guangzhou 510260, China; 3. College of Agronomy and Plant Protection, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China)

Abstract: 【Aim】 This study aims to isolate two sex determining genes (*transformer* and *transformer* 2), analyze their genomic DNA and cDNA structures and determine their expression profiles during different developmental stages and in adult tissues of the guava fruit fly, *Bactrocera correcta*. The findings will provide basic knowledge for further functional study of these two sex-determinating genes and the construction of the genetic sexing strain of the guava fruit fly. 【Methods】 The full-length cDNA sequences and their intronic seqences were isolated by PCR and RACE technique. The structure prediction, sequence alignment and phylogenetic analysis of the coding products of these two sex

基金项目：环保公益性行业科研专项（201409061）；农业部 2014 年农作物病虫鼠害疫情监测与防治（外来入侵生物防治）项目；人力资源社会保障部 2014 年度留学人员科技活动择优资助项目
作者简介：刘桂清，女，1981 年生，江西新余人，博士研究生，助理研究员，研究方向为昆虫分子生物学与外来生物入侵，E-mail：pepsiliu81@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: wanfanghao@caas.cn
收稿日期 Received: 2015-02-10；接受日期 Accepted: 2015-03-10

determining genes were performed by using different bioinformatics softwares. Based on the cDNA sequences of these two genes, specific primers were designed to investigate their developmental and tissue expression profiles by semi-quantitative RT-PCR. 【Results】 Two full-length cDNA sequences of *transformer* and *transformer* 2 were isolated from *B. correcta* and named as *Bcotra* and *Bcotra*-2, respectively. *Bcotra* is transcribed sex-specifically: female transtranscript is 1 673 bp in length, which encodes a polypeptide of 413 amino acids (GenBank accession number KP712876), while male transcript is 2 025 bp in length, which encodes a truncated and non-functional polypeptide with in-frame stop codons on the two addtional exons that do not exist in female transcript (GenBank accession number KP712877). No sex-specific transtript was detected in *Bcotra*-2. *Bcotra*-2 is 1 458 bp in length, which encodes a polypeptide of 251 amino acids with the classic characteristics of RNA binding proteins (GenBank accession number KM658207). *Bcotra*-2 harbors 8 exons and 7 introns. Sequence alignment and phylogenetic analysis of the products coded by these two sex determining genes respectively with the known Tra and Tra-2 from other Dipteran insects revealed that Bcotra-2 shows higher homology than that of Bcotra with their respective homologues. The semi-quantitative RT-PCR result showed that *Bcotra* and *Bcotra*-2 was expressed in different developmental stages and various adult tissues of *B. correcta*. 【Conclusion】 In this study, the genomic and cDNA stuctures of two sex determining genes were identified in *B. correcta*. Both *Bcotra* and *Bcotra*-2 were detected during different developmental stages and in various adult tissues. The presence of Tra/Tra-2 binding sites, intronic splicing silencer sequence and RNA binding protein binding sites suggests that the regulation of sex development in *B. correcta* may rely on the interation between the post-translation of *Bcotra* and *Bcotra*-2. The fragment of 963 bp female-specific intron of *Bcotra* can be used for the vector construction to develop genetic sexing strains.

Key words: *Bactrocera correcta*; sex determination; *transformer*; *transformer* 2; sex-specific splicing; expression profile

有性生殖是动物生命活动的基本特征,是个体繁衍后代并维持种族延续的方式,动物在进化的过程中呈现多样化的性别决定机制(Gempe and Beye, 2010)。目前,昆虫性别决定机制研究最为透彻的是模式昆虫黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* Meigen,黑腹果蝇性别决定是一个遗传级联式调控过程,X 信号元件(X-linked signal elements, XSEs) > *sex lethal* (*sxl*) > *transformer* (*tra*) + *transformer* 2 (*tra*-2) > *double sex* (*dsx*) (Cline and Meyer, 1996; Erickson and Quintero, 2007),性别决定起始于初始信号 XSEs,终止于控制性别分化的转换基因 *dsx*。*Dsx* 是性别决定通路上最为保守的性别决定基因,在双翅目昆虫(Shearman and Frommer, 1998; Kuhn *et al*., 2000; Hediger *et al*., 2004; Lagos *et al*., 2005; Ruiz *et al*., 2005; Scali *et al*., 2005)、鳞翅目昆虫(Ohbayashi *et al*., 2001)和膜翅目昆虫(Cho *et al*., 2007; Oliveira *et al*., 2009)中均鉴定到其同源基因。作为 *dsx* 上级的剪接调控基因 *tra*,先后在地中海实蝇 *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Pane *et al*., 2002)、按实蝇 *Anastrepha* sp. (Ruiz *et al*., 2007)、橄榄实蝇 *Bactrocera oleae* (Rossi) (Lagos *et al*., 2007)、铜绿蝇 *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (Concha and Scott, 2009)、家蝇 *Musca domestica* L. (Hediger *et al*., 2010)、意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* Spinola (Hasselmann *et al*., 2008)和丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* Walker (Verhulst *et al*., 2010)中分离得到。Tra 蛋白通过与 Tra-2 蛋白相互作用于下游基因 *dsx* 雌虫第 4 外显子,调控 *dsx* 的雌性特异剪接,产生 Dsx 雌性蛋白,调控雌虫性二型特征发育(Gempe and Beye, 2010)。利用 RNAi *tra*-2 的方法最早在家蝇中证明其在雌虫性别决定中不可或缺的作用(Burghardt *et al*., 2005),随后,在地中海实蝇(Salvemini *et al*., 2009)、家蝇(Hediger *et al*., 2010)和加勒比按实蝇 *A. suspensa* (Schetelig *et al*., 2012)中证明 *tra*-2 参与 *tra* 的自调控过程。

胚胎 RNAi 研究 *tra* 和 *tra*-2 基因功能发现,Tra 和 Tra-2 在建立和维持 Tra 的自我正反馈调控过程中发挥重要作用,调控胚胎向雌性方向发育,注射 *tra* 或 *tra*-2 的双链 RNA 片段于早期胚胎,XX 胚胎发育为表型为雄虫的 XX 假雄虫(Pane *et al*., 2002; Salvemini *et al*., 2009; Hediger *et al*., 2010; Sarno *et al*., 2010; Schetelig *et al*., 2012)。这种性别转换有益于只释放雄虫防治害虫的项目,如昆虫不育技术(sterile insect technique, SIT)不育雄虫释放项目(Knipling, 1955)。在地中海实蝇中,通过转基因 RNAi 的方法已开发遗传定性品系,条件诱导只产生

雄性子代，被证明具有广阔的应用前景（Saccone *et al*., 2007）。此外，利用 *tra* 性别特异剪接系统与四环素抑制致死系统和昆虫遗传转化技术结合，已在地中海实蝇和加勒比按实蝇等昆虫中开发出一种新的遗传定性系统（genetic sexing system），在无四环素条件下，雌虫全部死亡，而雄虫不受影响，自动分离雌、雄虫，实现不育雄虫释放，提高 SIT 防治效果的同时，降低 SIT 项目的成本（Fu *et al*., 2007；Schetelig and Handler, 2012；Ogaugwu *et al*., 2013）。我国是一个生物灾害发生频繁的农业大国，一方面，重大有害生物的为害严重降低作物的产量和品质，另一方面，生物入侵正成为威胁我国农林业生产、生物多样性与生态环境的重要因素之一。面对日益严重的外来入侵害虫的防治问题，除加强检疫外，昆虫不育技术已被证明是预防、围堵、镇压和根除重大实蝇害虫最有效的方法之一（Klassen and Curtis, 2005；Enkerlin, 2005）。因此，我国迫切需要借鉴国外先进经验，针对我国农、林、牧、渔业重大有害生物开展害虫遗传防治的基础和应用研究，实现本地有害生物的可持续治理和对外来入侵生物的有效狙击，确保我国未来的粮食和生态安全。

番石榴实蝇 *Bactrocera correcta*（Bezzi）隶属于双翅目（Diptera）、实蝇科（Tephritidae）、寡鬃实蝇亚科（Dacinae）、寡鬃实蝇族（Dacini），是多种热带、亚热带水果和蔬菜的重要害虫，主要危害番石榴 *Psidium guajava* L.、芒果 *Mangifere indica* L.、腰果 *Anacardium occidentale* L.、莲雾 *Syzygium samarangense* Merr. *et* Perry、牛油果 *Mimusops elengi* L.、樱桃 *Muntingia calabura* L.、榄仁 *Terminalia catappa* L.、枣 *Ziziphus jujube* Powder、蒲桃 *Syzygium jambos* Alston、人心果 *Manikara zapota* Royen 等 30 科 60 余种瓜果，主要分布在泰国、尼泊尔、印度、斯里兰卡和巴基斯坦，我国只在台湾和云南的元江县有发生的报道（梁广勤等，1996）。世界上许多国家和地区都将番石榴实蝇列为重要的危险性检疫害虫，我国农业部 2007 年 5 月 28 日颁布实施的《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》中，离腹寡毛实蝇属 *Bactrocera* Macquart 所有物种都被列为检疫性对象。目前，已分离得到番石榴实蝇性别决定基因 *dsx*（Permpoon *et al*., 2011），本研究利用同源基因克隆的方法克隆了番石榴实蝇性别决定基因 *dsx* 的上游基因 *tra* 和 *tra*-2，对这 2 个基因的结构特征进行了分析，并利用半定量 RT-PCR 对这两个基因在番石榴实蝇的不同发育阶段及雌、雄成虫不同组织的表达进行了分析，为进一步研究这 2 个基因的功能和开发番石榴实蝇遗传定性品系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

番石榴实蝇为广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心室内饲养虫源。成虫以人工饲料饲养，幼虫以番石榴鲜果饲养。饲养条件为 27 ± 0.5℃，RH 75% ± 5%，光周期为 14L∶10D。

1.2 实验试剂

总 RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司，异丙醇、氯仿、无水乙醇等分析纯购自北京化工厂；RACE 试剂盒 SMARTer RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司；第一链 cDNA 合成试剂盒 TransScript™ One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix、琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒 EasyPure Quick Gel Extraction Kit、克隆载体 *pEASY*-T1、感受态细胞 Trans1-T1 和 PCR 反应等试剂购自北京全式金生物技术有限公司；IPTG、X-Gal、氨苄青霉素购自上海生工生物工程股份有限公司。

1.3 总 RNA 提取和文库构建

用于目的基因克隆时，选取单头 1 日龄雌、雄成虫分别置于无 RNA 酶的 1.5 mL 离心管中，液氮速冻。用于不同发育时期和组织中基因表达分析时，分别收集番石榴实蝇卵（0 – 2 h，4 – 14 h，14 – 24 h，24 – 48 h）、1 龄幼虫、2 龄幼虫、3 龄幼虫，1 日龄蛹和 1 日龄雌、雄成虫及其组织样本（精巢、卵巢、中肠、脂肪体），其中，卵、幼虫及蛹均为雌、雄混合取样。取样数为各时间段的卵（各 50 粒左右），1 龄和 2 龄幼虫（各 10 头），3 龄幼虫（5 头），蛹（5 头），雌、雄成虫均为单头取样；而脂肪体、中肠、卵巢和精巢等组织的样本，则在 DEPC 水配制的 1 × PBS 缓冲液里解剖，共解剖雌、雄成虫各 20 头，挑取相应组织。将各发育时期或组织样本置于液氮速冻的无 RNA 酶的 1.5 mL 离心管中。研磨后，利用 Trizol 法分别提取上述样本的总 RNA，采用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 样本的完整性，IMPLEN 超微量紫外可见分光光度计（Nanophotometer™ P-Class）检测 RNA 的纯度和浓度，每个样本取 2 μg 总量的合格 RNA，按照第一链 cDNA 合成试剂盒说明书构建 cDNA 文库；参照 RACE 试剂盒说明书构建雌、雄成虫 5′RACE cDNA 和 3′RACE cDNA 文库；参照 Bender 等（1983）的方法提取单头成虫的基因组 DNA。

1.4　引物设计

根据地中海实蝇、橄榄实蝇、加勒比按实蝇同源 *tra* 和 *tra*-2 基因的氨基酸和核苷酸序列比对结果，分别设计简并引物 TF135/TR1008 和 T2F30/T2R530 扩增 *tra* 和 *tra*-2 的中间片段，根据获得的中间片段序列，分别设计 5′RACE 和 3′RACE 特异引物，扩增 *tra* 和 *tra*-2 基因的 cDNA 全长。根据克隆得到的 *tra* 和 *tra*-2 基因的全长序列以及推定的外显子区设计特异性引物扩增这 2 个基因的内含子序列，并设计特异引物用于半定量 RT-PCR，选择 *α-tubulin* 为内参基因。本研究所用引物均使用 Primer Premier 5.0 设计，引物详细信息见表 1。

表 1　本研究所用引物

Table 1　Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列（5′－3′）Primer sequence	引物用途 Use of primers
T2F30	TTCCCCACGTCGCAGTTACAC	*tra*-2 中间片段扩增 Amplification of intermediate fragment of *tra*-2
T2R530	TCAACTCTTATGCGCCGATCA	
TF135	GCGTAGATTCGGTGAAGGTTCA	*tra* 中间片段扩增 Amplification of intermediate fragment of *tra*
TR1008	CGGCACGGGTATGGTTATGAT	
T2 5′ out	TGGCAGTGGTGGTGGAGAAGGCGGTTGT	5′ RACE for *tra*-2
T2 5′ in	CTGGCGACTTGGTGTAACTGCGACGTGG	
T2 3′ out	TCCCGTAGCGCATACGAAAAGCGTCGTGGT	3′ RACE for *tra*-2
T2 3′ in	CGGATGCAAAGGCGGCCAAGGACG	
T 5′ out	CACGATCCATTGAAATTGACCGGCGGC	5′ RACE for *tra*
T 5′ in	GATTTGGTGAGTGTGATGCGTTACGTCGAGCTGC	
T 3′ out	GCCGCCGGTCAATTTCAATGGATCGTG	3′ RACE for *tra*
T 3′ in	CGTGAACGTTCGTCGCGTGTAGGTTCGCA	
T2F19	CATATTCAGAGCAAGCGGGCATTT	*tra*-2 内含子扩增和半定量 RT-PCR Intron amplification and semi-quantitative RT-PCR for *tra*-2
T2R1109	CAAAACACCCACGTAAGCAACCAAT	
T5F	GGATCGCGACAAACTGCATTAGAAG	*tra* 内含子扩增 Amplification of intron of *tra*
T1288R	GCAATGGTGGTAGAACAGCAGGCA	
T228F	GCAACATGTGCCCATGGGCTCA	*tra* 半定量分析 Semi-quantitative RT-PCR for *tra*
T685R	GAATTCTGTCTCGCTCCCTTACTTGGTCT	
α-tub F	CGCATTCATGGTTGATAACG	内参基因半定量 RT-PCR Semi-quantitative RT-PCR for reference gene
α-tub R	GGGCACCAAGTTAGTCTGGA	

1.5　性别决定基因 *Bcotra* 和 *Bcotra*-2 的克隆

首先，以单头雌、雄虫第一链 cDNA 为模板，采用简并引物 TF135/TR1008 和 T2F30/T2R530 分别扩增 *tra* 和 *tra*-2 的中间片段，PCR 反应体系 25 μL：灭菌 ddH_2O 水 19.5 μL，10 × PCR reaction buffer 2.5 μL，dNTP Mix（10 mmol/L）0.5 μL，上、下游引物（10 μmol/L）各 0.5 μL，TranStart Taq DNA 聚合酶（2.5 U）0.5 μL，cDNA 模板 1 μL。反应程序为 95℃ 变性 3 min；94℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 1 min，共 35 个循环；72℃ 延伸 7 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，将目的片段切胶并用琼脂糖凝胶回收试剂盒进行回收，回收片段连接到 pEASY-T1 克隆载体，转化 Trans1-T1 感受态细胞，蓝白斑筛选，翌日挑取白色单菌落，菌落 PCR 验证阳性克隆，送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序。

其次，利用 RACE 技术扩增 *tra* 和 *tra*-2 的 5′和 3′末端，实验操作参照 SMARTer RACE cDNA Amplification Kit 手册进行，扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收，并将回收产物连接到 pEASY-T1 克隆载体，转化 Trans1-T1 感受态细胞，菌落 PCR 筛选阳性克隆重组子送测序。

最后，以基因组 DNA 为模板，T5F/T1288R 为引物，PCR 扩增 *tra* 的内含子序列，T2F19/TR1109 扩增 *tra*-2 的内含子序列，反应体系与中间片段扩增的一致，PCR 反应程序为 95℃ 变性 3 min；94℃ 30 s，60℃ 30 s，72℃ 1 min，共 35 个循环；72℃ 延伸 7 min。PCR 产物经 1 % 琼脂糖凝胶电泳检测并回收，并将回收产物连接到 pEASY-T1 克隆载体，转化 Trans1-T1 感受态细胞，菌落 PCR 筛选阳性克隆重组子送测序。

1.6　序列分析

利用 Jemboss 软件进行核苷酸序列翻译，并预测蛋白质的分子量、等电点和跨膜结构域。NCBI 网站 Blast 工具对序列进行相似性比对分析，利用 Spidey 分析基因外显子和内含子的边界（http://

www. ncbi. nlm. nih. gov/spidey/)。利用 DNAMAN 进行氨基酸多序列比对。利用 MEGA 5.1 软件分析基因的演化关系,采用邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统进化树,置信度为 1 000 次,数值代表 bootstrap 估算值。

1.7 半定量 RT-PCR

以不同发育阶段的桔小实蝇和 1 日龄雌、雄成虫不同组织的第一链 cDNA 为模板,*α-tubulin* 为内参基因,半定量 RT-PCR 分析 *Bcotra* 和 *Bcotra*-2 的表达。反应体系为 20 μL:灭菌 ddH_2O 8 μL,2 × EasyTaq PCR Super Mix 10 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,cDNA 模板 1 μL。反应程序为 94℃变性 3 min;94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃1 min,目标基因 35 个循环,内参基因 25 个循环;72℃ 延伸 7 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果

2.1 番石榴实蝇 *Bcotra* 和 *Bcotra-2* 的克隆和序列分析

克隆得到番石榴实蝇 *Bcotra* 和 *Bcotra*-2 的基因组 DNA 和 cDNA 全长序列。*Bcotra* 存在雌、雄特异剪接,雌虫 *Bcotra* 的 cDNA 全长 1 673 bp,其开放读码框(ORF)为 1 242 bp,编码 413 个氨基酸,预测的分子量为 48.61 kDa,等电点为 6.68,不存在跨膜结构域(GenBank 登录号为 KP712876);雄虫 *Bcotra* 的 cDNA 全长 2 025 bp,比雌虫多 2 个雄虫特异的外显子 MS1 和 MS2,但 MS1 有 3 个终止密码子,MS2 有 2 终止密码子,因此,不能编码完整的有功能的 Tra 蛋白(GenBank 登录号为 KP712877)(图 1:A)。雌虫特异剪接的内含子序列为 963 bp (图 1:A,虚线框标注),鉴于 Tra-2 参与 Tra 的自调控过程,搜索该段序列的 Tra/Tra-2 结合位点、Tra-2 内含子剪接抑制结合位点(Tra-2 intronic splicing silencer sequence, Tra-2-ISS)(Qi *et al*., 2007)和 RNA 结合蛋白 RBP1 结合位点(RNA binding protein RBP1 binding sites)(Heinrichs and Baker, 1995)发现,这段序列共有 5 个 Tra/Tra-2 结合位点(13 个核苷酸, RCWMCAATCAACW),4 个 ISS 位点(CAAGA/G)和 2 个 RBP1 位点(ATCYNNA)。*Bcotra*-2 有 8 个外显子,7 个内含子,cDNA 全长 1 458 bp,ORF 为 756 bp,编码 251 个氨基酸(GenBank 登录号为 KM658207)。*Bcotra*-2 只有一种剪接方式,不存在性别特异剪接(图 1: B)。*Bcotra*-2 的基因组 DNA 序列共有 5 个 ISS 位点(CAAGA/G)和 13 个 RBP1 结合位点(DCADCTTTA 和 ATCYNNA 两种类型)。

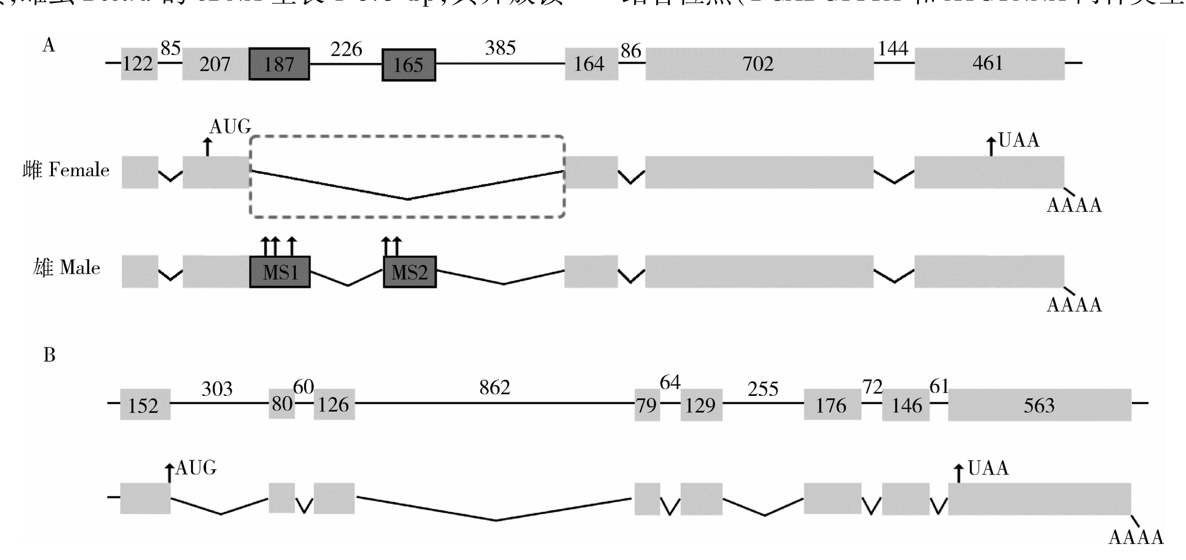


图 1 番石榴实蝇 *Bcotra* 和 *Bcotra*-2 的基因组和 cDNA 结构

Fig. 1 Genomic and cDNA structures of *Bcotra* and *Bcotra*-2 from *Bactrocera correcta*

A. *Bcotra* 的基因组结构(上部)及雌、雄虫特异剪接体(下部) Genomic structure of *Bcotra* (top) and sex-specific transcripts (lower part); B. *Bcotra*-2 的基因组结构(上部)及雌、雄相同的剪接体(下部) Genomic structure of *Bcotra*-2 (top) and the uni-sex transcript (lower part). 盒方框代表外显子,线代表内含子,框内和线上数字代表外显子和内含子大小(核苷酸数,bp);垂直箭头代表起始密码子和终止密码子的位置;两个深灰色的盒方框为雄虫特异外显子 MS1 和 MS2,含终止密码子;虚线框标注的是雌虫特异的 Bcotra 内含子,用于遗传定性品系的载体构建。Boxes stand for the exons with the number representing their lengths in base pair (bp). The lines indicate the introns with the numbers representing their lengths. The two boxes marked in dark gray represent male-specific exons (MS1 and MS2). Vertical arrows show the positon of start and stop codons. The dashed box in A is the female-specific intron that could be used for the establishment of genetic sexing strain.

2.2　番石榴实蝇 Bcotra 和 Bcotra-2 的序列比对和进化树分析

为明确新克隆得到的 *Bcotra* 和 *Bcotra*-2 的编码产物与其他双翅目的 Tra 和 Tra-2 间的关系，分别对 Bcotra 和 Bcotra-2 与其他双翅目的 Tra 和 Tra-2 蛋白进行氨基酸序列比对和进化树分析。序列比对结果显示，Bcotra 与橄榄实蝇 Bacoltra 的氨基酸序列一致性最高，达 78.7%，其次是地中海实蝇 Cercatra，一致性为 53.8%（图 2：A）。Bcotra-2 较 Bcotra 更加保守，其与橄榄实蝇 Bacoltra-2 的氨基酸序列一致性



图 2　Bcotra 和 Bcotra-2 分别与双翅目其他昆虫 Tra 和 Tra-2 氨基酸序列比对

Fig. 2　Amino acid sequence alignments of Bcotra and Bcotra-2 respectively with the known Tra and Tra-2 from other Dipteran insects

A：Bcotra 与双翅目其他昆虫的 Tra 氨基酸序列比对 Amino acid sequence alignment of Bcotra with known Tra from other Dipteran insects；B：Bcotra-2 与双翅目其他昆虫的 Tra-2 氨基酸序列比对 Amino acid sequence alignment of Bcotra-2 with known Tra-2 from other Dipteran insects. 所分析的 Tra 的来源及 GenBank 登录号 Origin of Tra proteins and their GenBank accession numbers：Cercatra：地中海实蝇 *Ceratitis capitata*（AF434936）；Bacoltra：橄榄实蝇 *Bactrocera oleae*（AJ715413）；Anasutra：加勒比按实蝇 *Anastrepha suspensa*（JN597286）；Bcotra：番石榴实蝇 *B. correcta*（KP712876）. 所分析的 Tra-2 的来源及 GenBank 登录号 Origin of Tra-2 proteins and their GenBank accession numbers：Bacoltra-2：橄榄实蝇 *Bactrocera oleae*（AJ547623）；Cercatra-2：地中海实蝇 *Ceratitis capitata*（EU999754）；Anasutra-2：加勒比按实蝇 *Anastrepha suspensa*（JN597290）；Luccutra-2：铜绿蝇 *Lucilia cuprina*（FJ461620）；Musdotra-2：家蝇 *Musca domestica*（AY847518）；Drometra-2：黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*（M23633）；Bcotra-2：番石榴实蝇 *B. correcta*（KM658207）. 黑色底纹表示所有比对的物种中相同的氨基酸，灰色底纹表示所有物种中一致性高于 75% 的氨基酸；B 图中红色竖线之间区域是 RNA 结合蛋白识别结构域，N 端和 C 端的蓝色竖线之间区域代表 RRM 侧翼的 2 个精氨酸/丝氨酸富集区，黑色上划线标明的是核糖核蛋白识别序列。The identical amino acids in all species are in black shade, and the amino acids with the identity higher than 75% are in gray shade. In figure B, the RNA recognition motif (RRM) locates between the red vertical lines, and the N- and C-terminal arginine/serine (RS)-rich regions locate between the blue vertical lines inside the amino acid sequences in each end. The two ribonucleoprotein identifier sequences, RNP-1 and RNP-2 are with black over lines.

最高，达 95.6%，其次是地中海实蝇 Cercatra-2，一致性为 90.1%，最低的是黑腹果蝇 Drometra-2，一致性为 44.2%。Bcotra-2 具有 RNA 结合蛋白的典型特征，即 RNA 识别基序（RNA recognition motif, RRM）及其侧翼的精氨酸和丝氨酸富集区（arginine/serine-rich regions, RS）和高度保守的核糖核蛋白鉴定序列（ribonucleoprotein identifier sequences, RNP-1 and RNP-2）（图 2：B）。

系统进化树结果显示，Bcotra 先与离腹寡毛实蝇属的 Tra 聚为一支，再与实蝇科的地中海实蝇、加勒比按实蝇和墨西哥实蝇的 Tra 聚在一起，与丽蝇科昆虫的遗传距离较远，与果蝇科的亲缘关系最远（图 3：A）。Bcotra-2 系统进化树结果与 Bcotra 一致（图 3：B）。

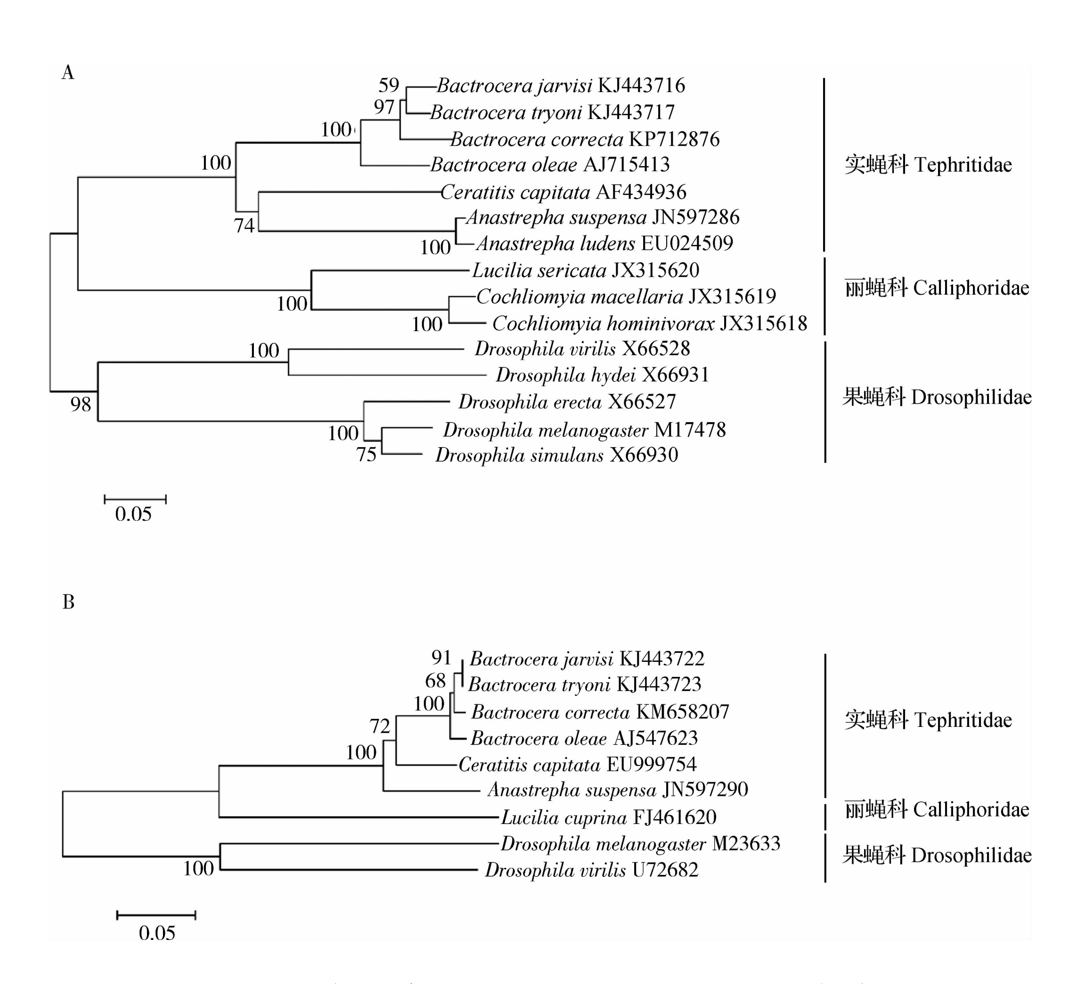


图 3 基于氨基酸序列构建的双翅目昆虫 Tra 和 Tra-2 的系统进化树（邻接法）

Fig. 3 Phylogenetic tree of Tra and Tra-2 reconstructed from Dipteran insects based on amino acid sequence with Neighbor-joining method

2.3 番石榴实蝇 *Bcotra* 和 *Bcotra-2* 的表达分析

半定量 RT-PCR 结果表明，*Bcotra* 和 *Bcotra*-2 在番石榴实蝇的不同发育阶段和雌、雄成虫的脂肪体、中肠、卵巢和精巢等组织中均有表达，*Bcotra* 在雌、雄混合的卵、幼虫和蛹期均检测到 458 bp 和 810 bp 两条带，与雌、雄虫特异的剪接体大小对应。*Bcotra*-2 在雌、雄混合的卵、幼虫和蛹期均检测到一条与预期大小一致的长度为 1 091 bp 的目的条带，各样本中 *Bcotra*-2 的表达无明显差异（图 4）。

3 讨论

本研究采用 PCR 结合 RACE 技术克隆得到 *Bcotra* 和 *Bcotra*-2 的基因组 DNA 和 cDNA 序列。*Bcotra* 存在性别特异剪接，雌虫剪接体编码有功能的 Tra 蛋白，而雄虫剪接体由于编码框内有多个终止密码子，只能编码截短的肽段，不能编码完全的蛋白。*Bcotra*-2 不存在雌、雄特异剪接，在雌、雄虫中均只有 1 种剪接体。研究结果与其他双翅目昆虫如

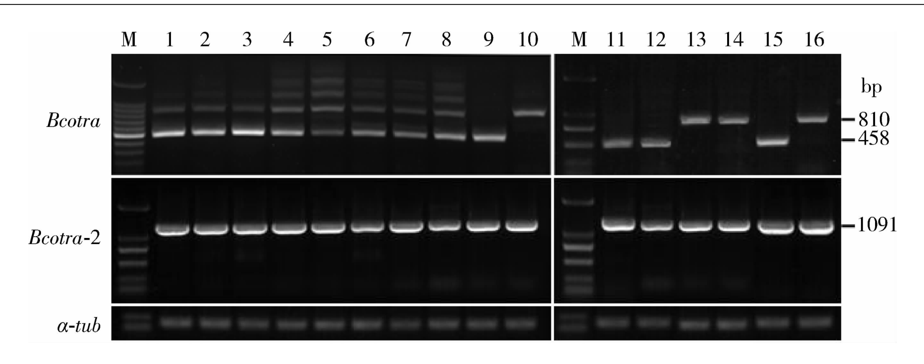


图 4　*Bcotra* 和 *Bcotra*-2 在番石榴实蝇不同发育阶段和成虫不同组织的表达模式

Fig. 4　Expression patterns of *Bcotra* and *Bcotra*-2 during different developmental stages and in adult tissues of *Bactrocera correcta*

M：DNA 分子量标记 DNA molecular weight marker；1－4：分别为雌雄混合的 0－2，4－14，14－24 和 24－48 h 的卵 0－2，4－14，14－24 and 24－48 h-old eggs after laying with mixed sexes，respectively；5－7：雌雄混合的 1，2 和 3 龄幼虫 1st，2nd and 3rd instar larvae with mixed sexes，respectively；8：雌雄混合的 1 日龄蛹 1-day-old pupae with mixed sexes；9：1 日龄雌成虫 1-day-old female adult；10：1 日龄雄成虫 1-day-old male adult；11：雌成虫中肠 Midgut of female adult；12：雌成虫脂肪体 Fat body of female adult；13：雄成虫中肠 Midgut of female adult；14：雄成虫脂肪体 Fat body of male adult；15：卵巢 Ovary；16：精巢 Testis.

地中海实蝇（Pane *et al*.，2002；Salvemini *et al*.，2009）、橄榄实蝇（Lagos *et al*.，2007）、家蝇（Burghardt *et al*.，2005）、按实蝇 *Anastrepha*（Ruiz *et al*.，2007；Sarno *et al*.，2010）等一致，*tra* 存在性别特异剪接，而 *tra*-2 雌、雄虫不存在性别特异剪接，且只有 1 种剪接体。但是，黑腹果蝇 *tra*-2 存在 4 种不同的剪接类型，其中 3 种剪接体编码氨基酸序列具核糖核蛋白鉴定序列和 RS 富集区，2 种剪接体在雌、雄虫中均检测到，另 2 个剪接体是雄虫生殖系特有，编码氨基酸最长的剪接体具有调控雌虫性别决定和雄虫生殖的能力（Amrein *et al*.，1990；McGuffin *et al*.，1998），另有研究表明，黑腹果蝇 *tra*-2 并不是通过雌虫特异的剪接体的表达来调控雌虫性别决定，而是通过翻译后与另一性别决定基因 *tra* 的翻译产物相互作用，从而调控雌虫性别决定（Mattox *et al*.，1990）。Bcotra-2 具有 RNA 结合蛋白的典型特征，即具有 1 个 RNA 识别基序 RRM 及其侧翼的 2 个 RS 富集区和非常保守的核糖核蛋白鉴定序列 RNP，这些特征暗示其参与 RNA 剪接的功能。在黑腹果蝇中，靠近 C 端的 RS 富集区和 RNP 被证明对雄虫不育和调控 *dsx* 雌性特异剪接具有重要的作用（Amrein *et al*.，1994）。

Bcotra 和 *Bcotra*-2 的基因组结构与地中海实蝇（Pane *et al*.，2002；Salvemini *et al*.，2009）和按实蝇（Ruiz *et al*.，2007；Sarno *et al*.，2010）相似，*tra* 的基因组结构差别主要体现在雄性特异外显子的个数不同，而 *Bcotra*-2 均具有 8 个外显子和 7 个内含子，*Bcotra* 的基因组 DNA 序列搜索到类似地中海实蝇和按实蝇的 Tra/Tra-2 结合位点，Tra-2 内含子剪接抑制位点 ISS 和 RNA 结合蛋白 RBP1 结合位点，此外，已分离得到的番石榴实蝇性别决定基因 *dsx* 基因结构保守，雌性 *dsx* 的 3′非翻译区存在推定的 Tra/Tra-2 结合位点作用的嘌呤富集元件（purine-rich element）和 4 个重复元件（*dsx* repeat element，*dsx*RE）（Permpoon *et al*.，2011），这些研究结果暗示 Tra 在进化过程中功能的保守性，*Bcotra* 类似地中海实蝇 Tra，通过 Tra 的自我调控，作用于下游 *dsx* 的性别特异剪接（Pane *et al*.，2002）。而 ISS 和 RBP1 位点的存在暗示了其可能通过与 RS 蛋白相互作用，从而激活或抑制 RNA 的剪接过程（Qi *et al*.，2007）。

氨基酸序列结果显示，*Bcotra* 和 *Bcotra*-2 分别与地中海实蝇 *tra* 和 *tra*-2 有较高的序列一致性，系统进化树进一步验证了序列比对结果。半定量 RT-PCR 结果表明，*Bcotra* 和 *Bcotra*-2 在番石榴实蝇的不同发育阶段和成虫不同组织中均有表达，且在胚胎早期(0－2 h 的卵)就存在雌、雄虫不同的 *Bcotra* 剪接体，由于雄性特异 *tra* 剪接体鲜有在雌性胚胎中表达（Morrow *et al*.，2014），本研究结果暗示 *tra* 的上游基因，即假定的雄性因子 *Dominant Male Determine*（*M*）（Willhoeft and Franz，1996）很有可能在胚胎极早期即有表达。

对比地中海实蝇遗传定性品系（Ogaugwu *et al*.，2013）建立中所采用的性别特异剪接系统，要构建番石榴实蝇遗传定性系统，在载体构建过程中，可以通过引入雌性特异的内含子，即一段 963 bp 的序列于致死基因的上游，从而调控致死基因仅在雌虫中表达。因此，*Bcotra* 和 *Bcotra*-2 的功能及番石榴实

蝇遗传定性品系的建立将是我们下一步的研究重点。

致谢 感谢广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心马骏老师提供番石榴实蝇虫源。

参考文献（References）

Amrein H, Hedley ML, Maniatis T, 1994. The role of specific protein-RNA and protein-protein interactions in positive and negative control of pre-mRNA splicing by Transformer 2. *Cell*, 76(4): 735－746.

Amrein H, Maniatis T, Nöthiger R, 1990. Alternatively spliced transcripts of the sex determining gene *tra*-2 of *Drosophila* encode functional proteins of different size. *EMBO J.*, 9: 3619－3629.

Bender W, Spierer P, Hogness DS, 1983. Chromosomal walking and jumping to isolate DNA from the *Ace* and *rosy* loci and the bithorax complex in *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.*, 168: 17－33.

Burghardt G, Hediger M, Siegenthaler C, Moser M, Dübendorfer A, Bopp D, 2005. The *transformer*2 gene in *Musca domestica* is required for selecting and maintaining the female pathway of development. *Dev. Genes Evol.*, 215: 165－176.

Cho S, Huang ZY, Zhang J, 2007. Sex-specific splicing of the honey bee *doublesex* gene reveals 300 million years of evolution at the bottom of the insect sex-determination pathway. *Genetics*, 177: 1733－1741.

Cline TW, Meyer BJ, 1996. Vive la difference: males vs females in flies vs worms. *Annu. Rev. Genet.*, 30: 637－702.

Concha C, Scott MJ, 2009. Sexual development in *Lucilia cuprina* (Diptera, Calliphoridae) is controlled by the *transformer* gene. *Genetics*, 182: 785－789.

Enkerlin WR, 2005. Impact of fruit fly control programmes using the sterile insect technique. In: Dyck V, Hendrichs J, Robinson AS eds. Sterile Insect Technique. Springer, Netherlands. 651－676.

Erickson JW, Quintero JJ, 2007. Indirect effects of ploidy suggest X chromosome dose, not the X∶A ratio, signals sex in *Drosophila*, *PLoS Biol.*, 5(12): e332.

Fu G, Condon KC, Epton MJ, Gong P, Jin L, Condon GC, Morrison NI, Dafa'alla TH, Alphey L, 2007. Female-specific insect lethality engineered using alternative splicing. *Nat. Biotechnol.*, 25: 353－357.

Gempe T, Beye M, 2010. Function and evolution of sex determination mechanisms, genes and pathways in insects. *BioEssays*, 33: 52－60.

Hasselmann M, Gempe T, Schiott M, Nunes-Silva CG, Otte M, Beye M, 2008. Evidence for the evolutionary nascence of a novel sex determination pathway in honeybees. *Nature*, 454: 519－522.

Hediger M, Burghardt G, Siegenthaler C, Buser N, Hilfiker-Kleiner D, Dübendorfer A, Bopp D, 2004. Sex determination in *Drosophila melanogaster* and *Musca domestica* converges at the level of the terminal regulator *doublesex*. *Dev. Genes Evol.*, 214: 29－42.

Hediger M, Henggeler C, Meier N, Perez R, Saccone G, Bopp D, 2010. Molecular characterization of the key switch *F* provides a basis for understanding the rapid divergence of the sex-determining pathway in the housefly. *Genetics*, 184: 155－170.

Heinrichs V, Baker BS, 1995. The *Drosophila* SR protein RBP1 contributes to the regulation of *doublesex* alternative splicing by recognizing RBP1 RNA target sequences. *EMBO J.*, 14: 3987－4000.

Klassen W, Curtis CF, 2005. History of the sterile insect technique. In: Dyck V, Hendrichs J, Robinson AS eds. Sterile Insect Technique. Springer, Netherlands. 3－36.

Knipling EF, 1955. Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *J. Econ. Entomol.*, 48: 459－462.

Kuhn S, Sievert V, Traut W, 2000. The sex-determining gene *doublesex* in the fly *Megaselia scalaris*: conserved structure and sex-specific splicing. *Genome*, 43: 1011－1020.

Lagos D, Koukidou M, Savakis C, Komitopoulou K, 2007. The *transformer* gene in *Bactrocera oleae*: the genetic switch that determines its sex fate. *Insect Mol. Biol.*, 16: 221－230.

Lagos D, Ruiz MF, Sánchez L, Komitopoulou K, 2005. Isolation and characterization of the *Bactrocera oleae* genes orthologous to the sex determining *Sex-lethal* and *doublesex* genes of *Drosophila melanogaster*. *Gene*, 348: 111－121.

Liang GQ, Yang GH, Liang F, Situ BL, Liang XD, 1996. *Bactrocera* Species in Asia-Pacific Area. Guangdong Science and Technology Press, Guangzhou. 58. ［梁广勤，杨国海，梁帆，司徒保禄，梁小丹，1996. 亚太地区寡毛实蝇. 广州：广东科技出版社. 58］

Mattox W, Palmer MJ, Baker BS, 1990. Alternative splicing of the sex determination gene *transformer*-2 is sex-specific in the germ line but not in the soma. *Genes Dev.*, 4: 789－805.

McGuffin ME, Chandler D, Somaiya D, Dauwalder B, Mattox W, 1998. Auto-regulation of *transformer*-2 alternative splicing is necessary for normal male fertility in *Drosophila*. *Genetics*, 149: 1477－1486.

Morrow JL, Riegler M, Frommer M, Shearman DCA, 2014. Expression patterns of sex-determination genes in single male and female embryos of two *Bactrocera* fruit fly species during early development. *Insect Mol. Biol.*, 23(6): 754－767.

Ogaugwu CE, Schetelig MF, Wimmer EA, 2013. Transgenic sexing system for *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) based on female-specific embryonic lethality. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 43: 1－8.

Ohbayashi F, Suzuki MG, Mita K, Okano K, Shimada T, 2001. A homologue of the *Drosophila doublesex* gene is transcribed into sex-specific mRNA isoforms in the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 128: 145－158.

Oliveira DCSG, Werren JH, Verhulst EC, Giebel JD, Kamping A, Beukeboom LW, van de Zande L, 2009. Identification and characterization of the *doublesex* gene of *Nasonia*. *Insect Mol. Biol.*, 18: 315－324.

Pane A, Salvemini M, Bovi PD, Polito C, Saccone G, 2002. The transformer gene in *Ceratitis capitata* provides a genetic basis for selecting and remembering the sexual fate. *Development*, 129: 3715－3725.

Permpoon R, Aketarawong N, Thanaphum S, 2011. Isolation and characterization of *Doublesex* homologues in the *Bactrocera* species: *B. dorsalis* (Hendel) and *B. correcta* (Bezzi) and their putative promoter regulatory regions. *Genetica*, 139: 113–117.

Qi J, Su S, Mattox W, 2007. The *doublesex* splicing enhancer components Tra2 and Rbp1 also repress splicing through an intronic silencer. *Mol. Cell. Biol.*, 27: 699–708.

Ruiz MF, Milano A, Salvemini M, Eirín-López JM, Perondini ALP, Selivon D, Polito C, Saccone G, Sánchez L, 2007. The gene *transformer* of *Anastrepha* fruit flies (Diptera, Tephritidae) and its evolution in insects. *PLoS ONE*, 2: e1239.

Ruiz MF, Stefani RN, Mascarenhas RO, Perondini ALP, Selivon D, Sánchez L, 2005. The gene *doublesex* of the fruit fly *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae). *Genetics*, 171: 849–854.

Saccone G, Pane A, de Simone A, Salvemini M, Milano A, Annunziata L, Mauro U, Polito LC, 2007. New sexing strains for Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*: transforming females into males. In: Vreysen MJB, Robinson AS, Hendrichs J eds. Area-wide Control of Insect Pests: From Research to Field Implementation. Springer, Netherlands. 95–102.

Salvemini M, Robertson M, Aronson B, Atkinson P, Polito LC, Saccone G, 2009. *Ceratitis capitata transformer*-2 gene is required to establish and maintain the autoregulation of *Cctra*, the master gene for female sex determination. *Int. J. Dev. Biol.*, 53: 109–120.

Sarno F, Ruiz MF, Eirín-López JM, Perondini AL, Selivon D, Sánchez L, 2010. The gene *transformer*-2 of *Anastrepha* fruit flies (Diptera, Tephritidae) and its evolution in insects. *BMC Evol. Biol.*, 10: 140.

Scali C, Catteruccia F, Li Q, Crisanti A, 2005. Identification of sex-specific transcripts of the *Anopheles gambiae doublesex* gene. *J. Exp. Biol.*, 208: 3701–3709.

Schetelig MF, Handler AM, 2012. A transgenic embryonic sexing system for *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 42: 790–795.

Schetelig MF, Milano A, Saccone G, Handler AM, 2012. Male only progeny in *Anastrepha suspensa* by RNAi-induced sex reversion of chromosomal females. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 42: 51–57.

Shearman DCA, Frommer M, 1998. The *Bactrocera tryoni* homologue of the *Drosophila melanogaster* sex-determination gene *doublesex*. *Insect Mol. Biol.*, 7: 355–366.

Verhulst EC, Beukeboom LW, van de Zande L, 2010. Maternal control of haplodiploid sex determination in the wasp *Nasonia*. *Science*, 328 (5978): 620–623.

Willhoeft U, Franz G, 1996. Identification of the sex-determining region of the *Ceratitis capitata* Y chromosome by deletion mapping. *Genetics*, 144: 737–745.

（责任编辑：袁德成）